

ORIGEN DE LAS ABEJAS

Agra, M. N.; Palacio, M. A.; Ruffinengo, S.; García, C.; Varela, M. S.; Martínez, A. N.; Franco, M. del R.

TAXONOMÍA Y ORIGEN DE *A. mellifera*

Las abejas melíferas se encuentran dentro del Phylum Arthropoda, Clase Insecta, Orden Hymenoptera, Familia Apidae y género *Apis*. Además de *A. mellifera*, el género *Apis* está conformado por otras 8 especies: *A. dorsata* o "abeja gigante", *A. cerana* o "abeja oriental", *A. florea* o "abeja enana", *A. nigrocincta*, *A. koschevnikovi*, *A. andreniformis*, *A. nuluensis* y *A. laboriosa* (Garnery *et al.*, 1991; Koeniger y Koeniger, 2000; Franck *et al.*, 2000; Le Conte y Navajas, 2008). Además de *A. mellifera*, la otra especie explotada comercialmente es *A. cerana*, principalmente en China, aunque aún en Asia está siendo reemplazada por *A. mellifera* en condiciones de apicultura comercial. La distribución de las otras especies del género *Apis* está restringida a su lugar de origen (Fig. 1), ocupando las distintas áreas boscosas del Extremo Oriente, y no son explotadas comercialmente. Debido a su importancia económica como productora de miel y principalmente por su actividad como polinizadora de cultivos, *A. mellifera* es el insecto social utilizado con fines comerciales con mayor distribución en el mundo (Fig. 1).

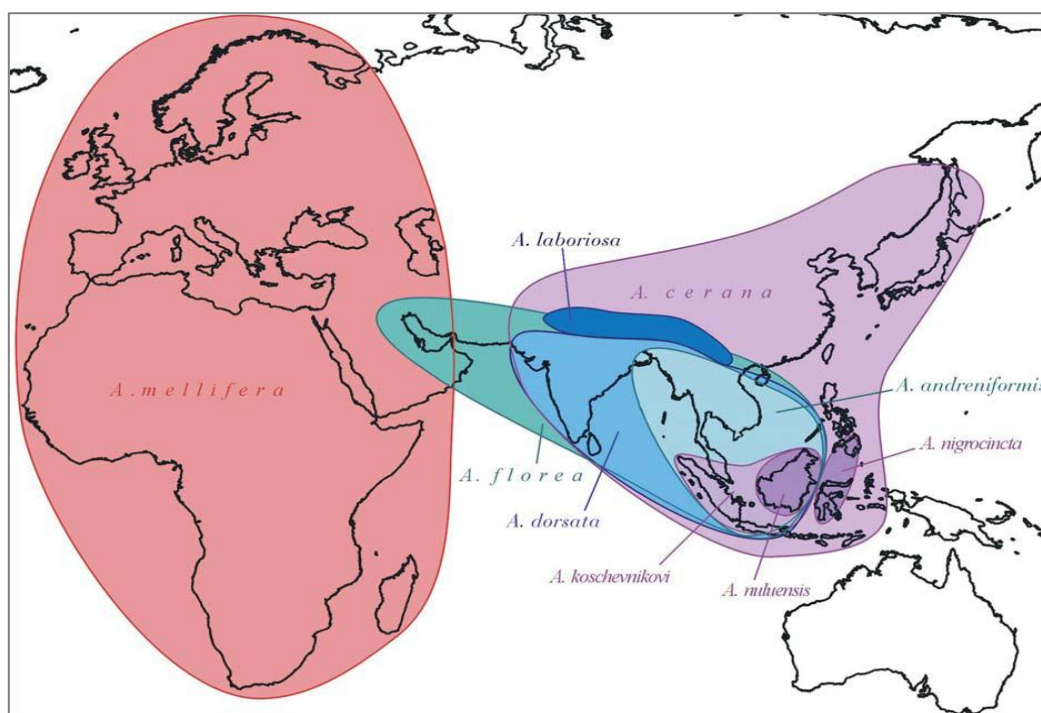


Figura 1. Distribución mundial de las distintas especies del género *Apis* (Le Conte y Navajas, 2008; Franck *et al.*, 2000).

Apis mellifera (Linnaeus, 1758) es un insecto social benéfico, considerado el principal polinizador de cultivos comerciales y especies vegetales silvestres (Buchmann y Nabhan, 1996; Klein *et al.*, 2007; Brown y Paxton, 2009), como asimismo el principal productor de miel. Se considera actualmente que existen 4 brazos evolutivos (A, C, M y O) donde se distribuyen las distintas subespecies de *A. mellifera*, aunque el origen geográfico de *A. mellifera* es todavía un tema controversial y ha propiciado el surgimiento de diferentes hipótesis. Tres posibles escenarios se han planteado que muestran el origen evolutivo de *A. mellifera*. El primero, descrito por Ruttner *et al.* (1978), sugiere que esta especie tiene su centro de origen en el Medio Oriente o el noreste de África, desde donde colonizó Europa a través de dos rutas: una ruta directa a través del este de Europa y otra ruta occidental a través del norte de África y la Península Ibérica. Esta hipótesis se basa en el análisis morfológico que sugiere la continuidad entre los brazos evolutivos (o linajes) A (África) y M (oeste y norte de Europa) (Fig. 2a). Una segunda hipótesis, basada principalmente en el análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) (Cornuet y Garnery, 1991; Garnery *et al.*, 1992), también propone un origen en Oriente Medio, pero no incluye la colonización de Europa a través de una ruta occidental. Esta hipótesis se basa en árboles filogenéticos que agrupan a los brazos evolutivos A y C (este de Europa), este último en lugar del brazo evolutivo M, y argumenta en contra de la migración a través del estrecho de Gibraltar (Fig. 2b). La tercera hipótesis plantea un origen africano y fue propuesta por Wilson (1971), basada en el comportamiento de las abejas de formar el denominado "clúster de invierno" para mantener la homeostasis de la colonia necesaria en los climas templados. Se basa en que actualmente *A. mellifera* no se encuentra distribuida en los trópicos de Asia, por lo que plantea que un origen africano es el más plausible. Un estudio genético realizado por Whitfield *et al.* (2006) con 1136 SNPs (polimorfismos de nucleótido único), analizando 341 individuos de 14 subespecies geográficas de *A. mellifera* y tres grupos externos (*A. cerana*, *A. florea* y *A. dorsata*), argumenta a favor de esta última hipótesis (Fig. 2c).

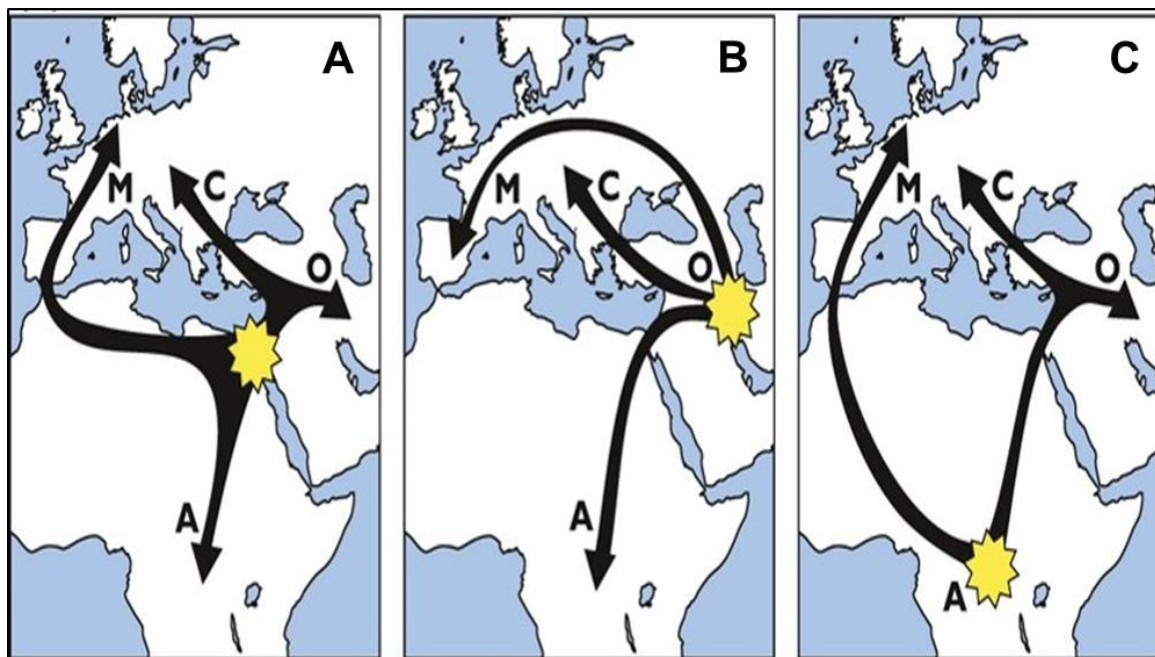


Figura 2. Esquema de las tres hipótesis del origen de *Apis mellifera* y su posterior distribución (Han *et al.*, 2012).

Sin embargo, la divergencia entre los brazos evolutivos M y C, y la existencia de un brazo evolutivo O (Oriente Medio), filogenéticamente relacionado a C, continúa generando controversias en el origen geográfico de esta especie (Wallberg *et al.*, 2014).

Superando las controversias surgidas respecto al origen de la especie, existe un consenso en el patrón de dispersión de las abejas por Europa y Asia. En África y sur de la Península Ibérica se dispersó el brazo A. En el norte de la Península Ibérica y noroeste de Europa (incluyendo las islas británicas) se desplazó el brazo M. El brazo C se extendió desde la península italiana y Europa del este hasta el Oriente Medio. El cuarto brazo O se dispersó en una restringida zona del noreste de África y el Cercano Oriente, en Egipto y Líbano (Franck *et al.*, 2001; Whitfield *et al.*, 2006; Wallberg *et al.*, 2014).

Más de 26 subespecies de *A. mellifera* han sido descritas, tanto a nivel morfológico como molecular, adaptadas a distintas condiciones climáticas y ecológicas (Fig. 3). Del total de subespecies reconocidas, las más representativas de cada brazo evolutivo son: *A. m. mellifera* (Linnaeus, 1758) y *A. m. iberiensis* (Engel, 1999), 2 subespecies representativas del brazo M; *A. m. ligustica* (Spinola, 1806) y *A. m. carnica* (Pollman, 1879), representativas del brazo C; *A. m. scutellata* (Lepelletier, 1836) y *A. m. adansonii* (Latreille, 1804), representativas del brazo A (Ruttner *et al.*, 1978; Clarke *et al.*, 2001); y por último, *A. m. syriaca* (Skorikov, 1829) y *A. m. anatoliaca* (Maa, 1953), dos subespecies del brazo O.

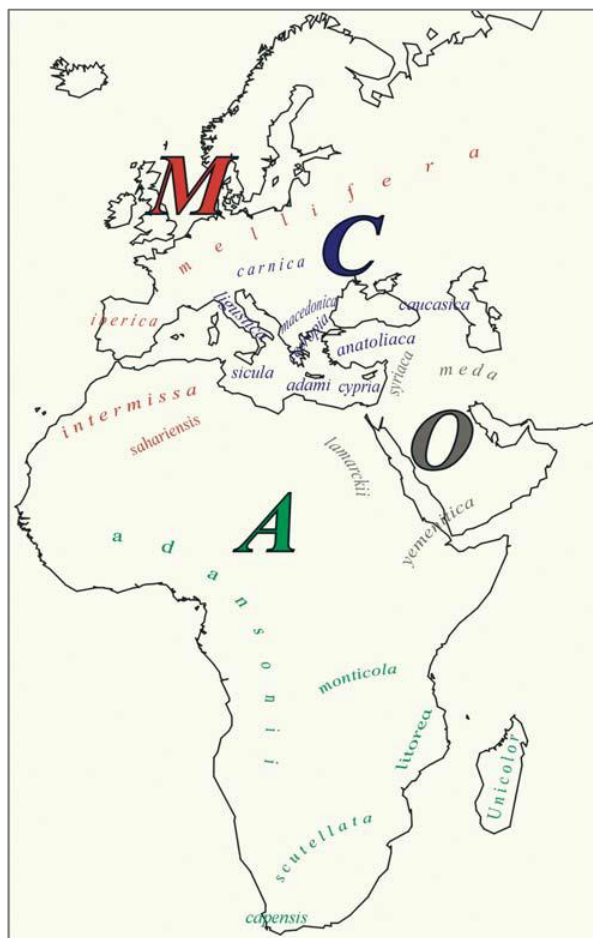


Figura 3. Distribución de las principales subespecies de *A. mellifera* en su lugar de origen (Le Conte y Navajas, 2008; Ruttner, 1988).

Las abejas del brazo evolutivo A se caracterizan por su reducido tamaño, alto comportamiento defensivo y alta tasa de enjambrazón y abandono de colmena; sobre todo las subespecies del sur de África, *A. m. scutellata* y *A. m. capensis*. Las abejas europeas, tanto del brazo evolutivo M como del C, tienen un tamaño mayor a las del brazo A, poseen bajo comportamiento defensivo y una reducida tasa de abandono de colmena. Estas abejas están adaptadas a climas templados a fríos. La subespecie *A. m. ligustica* (brazo evolutivo C), o abeja italiana, hoy en día es la abeja más difundida en la apicultura comercial, principalmente por su productividad y mansedumbre, llegando a desplazar otras subespecies de su ambiente natural, como sucede con *A. m. mellifera* (brazo evolutivo M) en los países escandinavos (Jensen *et al.*, 2005).

INTRODUCCIÓN DE *A. mellifera* en América y en Argentina

La abeja melífera fue introducida al continente americano (isla de Santo Domingo) durante los siglos XV-XVI, en el marco de la colonización española. Sin embargo, otras fuentes aseguran que fueron los padres dominicos, en el año 1536, los responsables de la introducción de la abeja en el continente americano. Las abejas introducidas pertenecían al brazo M (*A. m. mellifera*).

Posteriormente, se registraron introducciones de la subespecie *A. m. ligustica* (brazo C), pero se desconoce la fecha exacta (Bierzzychudek, 1979).

Los registros mencionan a *A. mellifera* en Sudamérica hacia 1830, cuando arriban a Colonia del Sacramento (Uruguay) las primeras cuatro colmenas de *A. m. mellifera* (brazo M) provenientes de Francia (Bierzzychudek, 1979). Simultáneamente, la subespecie *A. m. carnica* (brazo C) fue introducida en Río Grande do Sul (Brasil) por colonos alemanes, y posteriormente, en este mismo lugar, en el año 1839, el padre Antonio Carneiro introdujo colonias desde Porto (Portugal), las cuales pertenecían a la subespecie *A. m. iberiensis* (brazo M).

En Argentina se produjeron sucesivas introducciones desde diferentes países y hacia distintas provincias. Así, en 1855 fueron introducidas abejas de la subespecie *A. m. ligustica* en la provincia de Mendoza desde Chile, y en 1857 fueron enviadas a Gualeguaychú (Entre Ríos) 4 colmenas de *A. m. mellifera* provenientes de Montevideo (Uruguay), con lo que se inició la multiplicación de material en esa zona (Bierzzychudek, 1979).

La introducción de nuevos materiales continuó durante el siglo XX, principalmente de *A. m. ligustica* o abeja italiana, preferida por su mansedumbre y productividad (Palacio y Bedascarrasbure, 1998), como así también *A. m. carnica* y *A. m. caucasica* (Salizzi, 2014). En Brasil se efectuó, en el año 1956, la introducción de *A. m. scutellata* (brazo A), con la finalidad de originar híbridos con abejas de origen europeo que presentaran una mejor adaptación al clima tropical-subtropical de ese país (Kerr *et al.*, 1970). Accidentalmente, estas colonias abandonaron sus colmenas y comenzó un proceso masivo de hibridación conocido como "africanización" que continúa en la actualidad (Fig. 4). Las abejas africanizadas, producto de esta hibridación, se caracterizan por tener un alto comportamiento defensivo y una alta tasa de enjambrazón y abandono de colmena, características poco deseables en la apicultura comercial (Taylor, 1977; Brandeburgo *et al.*, 1977; Spivak *et al.*, 1991; Lobo Segura, 2000; Clarke *et al.*, 2002). Las abejas africanizadas fueron detectadas por primera vez en nuestro país en 1965, en la provincia de Misiones (De Santis y Cornejo, 1968).

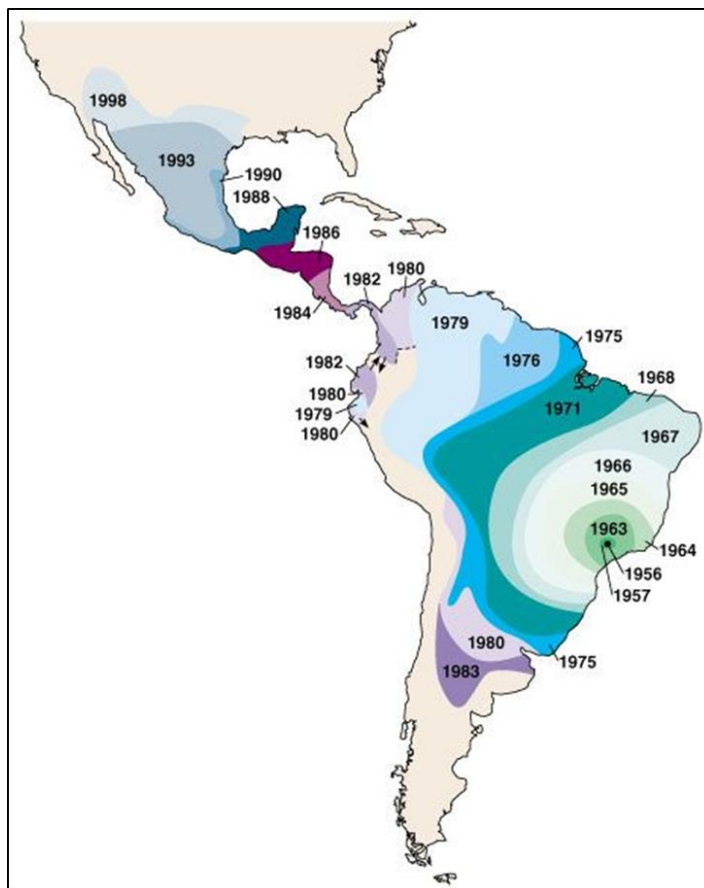


Figura 4. Dispersión de la abeja africanizada en el continente americano.

CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD PRESENTE EN *A. mellifera*

Se han desarrollado diversas técnicas para la caracterización de *A. mellifera*. La primera técnica en utilizarse fue la morfometría, mediante la medición de distintas partes del cuerpo de la abeja obrera (caracteres morfométricos) (Ruttner, 1978; Meixner *et al.*, 2013). Con el advenimiento de las técnicas moleculares se comenzó a analizar la variabilidad existente en las aloenzimas (Mestriner y Contel, 1972). Posteriormente, con el desarrollo de técnicas moleculares como la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se analizó la variabilidad en el ADN mitocondrial y nuclear de *A. mellifera* (Smith, 1991; Estoup *et al.*, 1993).

MORFOMETRÍA

La morfometría, basada en la medición de determinadas partes del cuerpo del insecto (alas, cabeza y longitud total), permitió realizar los primeros estudios de caracterización de las distintas subespecies de abejas (Ruttner *et al.*, 1978). Sin embargo, estas características morfométricas muestran cambios graduales y sus intervalos se superponen (Meixner *et al.*, 2010, 2013), siendo necesario utilizar varios caracteres al mismo tiempo y aplicar métodos estadísticos para poder discriminar entre grupos. Caracteres de tamaño corporal, pilosidad, nervaduras alares y patrones de coloración se han utilizado en los análisis morfométricos, a

partir de los primeros estudios realizados por Alpatov (1929). Un conjunto de 36 caracteres seleccionados por su poder discriminativo, denominado "morfometría clásica", ha sido descripto por Ruttner (1988). En la actualidad se utilizan un número variable de medidas morfométricas que no superan el número de 10, en función de su poder discriminante (Meixner *et al.*, 2013; Mladenovic *et al.*, 2011). En Argentina la morfometría se ha utilizado para caracterizar abejas provenientes de distintas regiones del país (Andere *et al.*, 2000; Andere *et al.*, 2008; García *et al.*, 2006), y se ha aplicado juntamente con la evaluación de caracteres comportamentales (alto comportamiento defensivo). Las medidas utilizadas para estos estudios fueron longitud de la probóscide; longitud, ancho y ángulos de nervios en el ala delantera derecha; longitud, ancho y ángulos de las venas del ala posterior derecha; longitud de tibia, fémur y metatarso, y ancho de metatarso, y han sido de gran utilidad para determinar diferentes ecotipos y africanización en diferentes poblaciones de *A. mellifera* (Andere *et al.*, 2008). La morfometría geométrica se basa en las coordenadas de los puntos de referencia ubicados en las intersecciones de las venas del ala (Bookstein, 1997; Smith *et al.*, 1997). Los avances fundamentales de la morfometría geométrica sobre los enfoques tradicionales incluyen (i) la forma en que se puede medir la diferencia de formas (utilizando la distancia de Procrustes), (ii) la elucidación de las propiedades del espacio de forma multidimensional definido por este coeficiente de distancia, (iii) el desarrollo de métodos estadísticos especializados para el estudio de la forma, y (iv) el desarrollo de nuevas técnicas para las representaciones gráficas de los resultados (Bookstein, 1997; Rohlf, 2000; Mendes *et al.*, 2007).

MARCADORES MOLECULARES EN EL ADN

ADN mitocondrial

El genoma mitocondrial es una molécula circular de ADN de aproximadamente 16.000 pares de bases presente en las mitocondrias (Fig. 5). Posee herencia materna, genes de copia única, ausencia de recombinación y una alta tasa de evolución (Avice *et al.*, 1984; Simon *et al.*, 1994). Estas características, sumadas a la gran cantidad de mitocondrias por célula y a la cantidad de copias del genoma por mitocondria (varía entre 1.000 y 10.000 copias), facilitan su estudio desde el punto de vista metodológico y experimental (Birky, 1995).

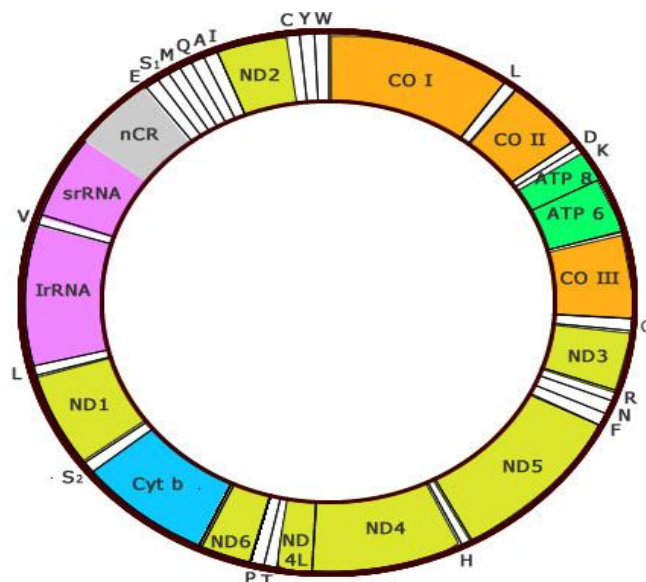


Figura 5. Esquema del ADNmt de *Apis mellifera*. Adaptado de Crozier y Crozier (1993).

En particular para *A. mellifera*, la variabilidad genética presente en las regiones no codificantes del ADN mitocondrial (ADNmt) ha permitido detectar diferencias a nivel de subespecies (Smith *et al.*, 1991; Arias *et al.*, 1996). Los principales métodos moleculares utilizados para el análisis de variaciones en el ADNmt en abejas son: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism); PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) y la secuenciación directa. Las variaciones detectadas mediante RFLP se revelan a través de la digestión de todo el genoma mitocondrial con endonucleasas de restricción. Los primeros trabajos realizados con distintas subespecies de *A. mellifera* en su lugar de origen (Smith *et al.*, 1991; Garnery *et al.*, 1992; Arias *et al.*, 1996) o donde las mismas fueron introducidas (Smith y Brown, 1988; Hall y Muralidharan, 1989; Smith *et al.*, 1989) mostraron el poder discriminativo de esta técnica y confirmaron la presencia de tres brazos evolutivos (A, C y M) previamente descritos por Ruttner (1978, 1988) mediante el uso de la morfometría. Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular modernas, el método de RFLP se ha sustituido por la técnica de PCR-RFLP, principalmente porque para implementar el primero, se necesita una considerable cantidad de ADNmt no degradado y además requiere mayor tiempo de procesamiento. En ambos métodos, los haplotipos se determinan mediante el empleo de enzimas de restricción. Sin embargo, a diferencia de la técnica de RFLP, que analiza todo el genoma mitocondrial, la variación que detecta la técnica PCR-RFLP se revela dentro de una región específica amplificada por PCR.

Varias regiones específicas de ADNmt han sido utilizadas en los primeros trabajos realizados con esta técnica, tanto para determinar africanización en poblaciones de *A. mellifera* en América (Hall y Smith, 1991; Clarke *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2004) como subespecies en poblaciones de *A. mellifera* de Europa del Este (Smith *et al.*, 1997; Bouga *et al.*, 2005; Ivanova

et al., 2010; Stevanovic *et al.*, 2010). Uno de los primeros marcadores desarrollados fue el gen Citocromo B (Cit B), junto con el uso de la enzima de restricción Bgl II, cuyos primers flanquean un amplicón de 485 pares de bases (pb) de longitud. La enzima realiza un corte específico generando dos bandas (una de 291 pb y otra de 194 pb) en las abejas de origen europeo, y no realiza ningún corte en las abejas de origen africano (Crozier *et al.*, 1991). Este marcador determina si la muestra analizada es de origen europeo o africano, pero no discrimina las distintas subespecies y haplotipos a los que pertenecen las abejas analizadas. Este marcador se ha utilizado para determinar el grado de africanización en América (Pinto *et al.*, 2003).

Uno de los marcadores más utilizados es la región intergénica entre los genes Citocromo Oxidasa I y Citocromo Oxidasa II (COI-COII), que presenta al menos siete variantes en su longitud que pueden ser explicadas por la combinación de tres secuencias relacionadas: la secuencia Po, con una longitud de 67 pares de bases (67 pb); la secuencia P (54 pb); y la secuencia Q (192-196 pb). Esta última secuencia se encuentra presente en todas las subespecies y se divide en tres regiones según su similitud con las regiones adyacentes del ADNmt: Q1 es similar al extremo 3' del gen COI, Q2 es similar al gen del ARNt_{leu} y Q3 a la secuencia P (Cornuet *et al.*, 1991). Las diferentes combinaciones de estas secuencias generan las siguientes variantes: PoQ, PoQQ y PoQQQ, que son características del brazo evolutivo A; las secuencias PQ, PQQ y PQQQ, representativas del brazo evolutivo M; y solo Q, correspondiente al brazo evolutivo C (Garnery *et al.*, 1993). Estas secuencias acumulan gran cantidad de mutaciones, deleciones e inserciones que generan polimorfismos evidenciados en forma rápida y sencilla por medio de enzimas de restricción, entre las cuales la más utilizada es DraI, aunque también HinfI y EcoRI sirven para la determinación de diferentes haplotipos. La combinación de tamaño y sitios de restricción generados en el análisis de la región intergénica COI-COII con el uso de la enzima DraI ha permitido describir más de 100 haplotipos (Franck *et al.*, 2001; De la Rúa *et al.*, 2005; Collet *et al.*, 2006; Shaibi *et al.*, 2009; Alburaki *et al.*, 2011; Rortais *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2012).

ADN nuclear

En el ADN nuclear de la mayoría de los eucariotas pueden localizarse regiones denominadas microsatélites o SSRs (*Simple Sequence Repeats*). Estas regiones genómicas constituyen un tipo de marcadores de ADN que involucra un número variable de repeticiones en tándem de 1 a 5 pares de bases. Para ser consideradas como marcador microsatélite, estas repeticiones de secuencias cortas deben hallarse desde 5 a más de 100 veces en un lugar único del genoma nuclear. Los diferentes alelos se caracterizan por un largo exacto en pares de bases de un fragmento de ADN específico obtenido por la técnica de PCR, mediante el empleo de cebadores localizados en las secuencias que flanquean la región de las repeticiones en tándem (Tautz, 1990). Tienen la característica de ser neutros, por lo cual son muy utilizados para realizar

estudios poblacionales de variabilidad genética, y son codominantes, posibilitando la detección de los alelos provenientes de ambos parentales. Asimismo, se describen como altamente polimórficos, debido a que poseen una alta tasa mutacional (entre 10^{-5} y 10^{-2} mutaciones por generación) que asegura la generación de un gran número de alelos (Levinson y Gutman, 1987; Estoup *et al.*, 1995; Clarke *et al.*, 2002; Consortium HGS, 2006; Krauss *et al.*, 2007).

El uso conjunto de marcadores moleculares ha permitido profundizar los conocimientos sobre aspectos genéticos y dispersión de las poblaciones de abejas. Franck *et al.* (1998) analizaron el origen de *A. mellifera* de Europa occidental mediante el empleo de microsatélites y haplotipos mitocondriales. El análisis mediante el uso de microsatélites demostró que las abejas ibéricas eran genéticamente homogéneas, formando un clúster, pese a presentar 2 haplotipos distintos (Smith *et al.*, 1991; Garnery *et al.*, 1992; Garnery *et al.*, 1995; De la Rúa *et al.*, 1999), con una influencia limitada del norte de África. Métodos similares se utilizaron para determinar la variación en las abejas procedentes de Oriente Medio, que llevaron a la hipótesis de un cuarto linaje (*op. cit.*) basado en datos moleculares (Franck *et al.*, 2000). Un estudio del proceso de africanización relacionado con el tiempo en la península de Yucatán demostró la fuerza de los microsatélites en la detección de híbridos entre abejas de origen europeo y africano, es decir, abejas "africanizadas" (Clarke *et al.*, 2002).

Un método alternativo al análisis de los estadísticos F y los árboles filogenéticos es la prueba de asignación, que se puede aplicar con algunas variaciones (Manel *et al.*, 2005). La asignación determinística compara el genotipo de cada individuo en relación a agrupaciones definidas en función de la ubicación del muestreo u otras categorías posibles. Por otra parte, las asignaciones bayesianas se utilizan sin tener conocimiento previo del número de poblaciones y determinan la mejor clasificación de los genotipos. Así, el número de grupos es variable sin tener en cuenta el origen, siendo el programa Structure (Pritchard *et al.*, 2000) el más utilizado. Existen métodos más objetivos para determinar el número óptimo de grupos para un determinado conjunto de datos, basado en la probabilidad posterior calculada (Evanno *et al.*, 2005). El método bayesiano es sensible y puede asignar a las poblaciones en varios niveles, como subespecies estrechamente relacionadas y brazos evolutivos. Un ejemplo de este método en las abejas melíferas es un estudio de los diversos niveles de introgresión de *A. m. ligustica* en poblaciones de *A. m. mellifera* en los países escandinavos (Jensen *et al.*, 2005).

Recientemente se han desarrollado marcadores genómicos como los marcadores de polimorfismo de nucleótido único (SNP). Un SNP es un cambio de una única base nucleotídica en una posición dada de una secuencia de ADN y son en general bialélicos. Respecto a su aplicación en *A. mellifera*, se utilizaron en estudios evolutivos que han contribuido a tener una comprensión integral del origen y dispersión de las subespecies, como también análisis de

introgresión y africanización (Whitfield *et al.*, 2006; Zayed y Whitfield, 2008). Asimismo, han sido utilizados para realizar estudios de asociación entre caracteres comportamentales y genéticos (Spötter *et al.*, 2012). En la actualidad existen nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, que permiten la obtención de gran cantidad de datos de alta calidad que facilitan la generación de información e intercambio de datos entre laboratorios y el desarrollo de bases de datos públicas (Niedringhaus *et al.*, 2011; Pareek *et al.*, 2011; Haddad *et al.*, 2015).

Antecedentes de caracterización poblacional de *A. mellifera* en Argentina.

A fin de determinar la existencia de abejas "africanizadas", las primeras evaluaciones en Argentina fueron realizadas por De Santis y Cornejo (1968) a partir del comportamiento defensivo, también considerado como "agresividad". Posteriormente, se aplicaron técnicas morfométricas para discriminar abejas europeas de africanizadas (Brandeburgo *et al.*, 1977) (Fig. 6A). Sheppard *et al.* (1991) realizaron los primeros trabajos de caracterización molecular con el análisis del ADN mitocondrial total de abejas mediante la técnica de RFLP. Los autores analizaron muestras de abejas de la zona noreste de nuestro país, con epicentro en la provincia de Tucumán, realizando transectas en dirección sur y oeste para confirmar la presencia de africanización. Los autores registraron una zona de saturación donde solo detectaron abejas africanizadas; una zona de colonización permanente o zona de transición, caracterizada por una compleja hibridación entre abejas de origen europeo y africano; y una zona de colonización temporaria, donde las abejas africanizadas solo se encontraban en los meses de primavera y verano (Fig. 6B).

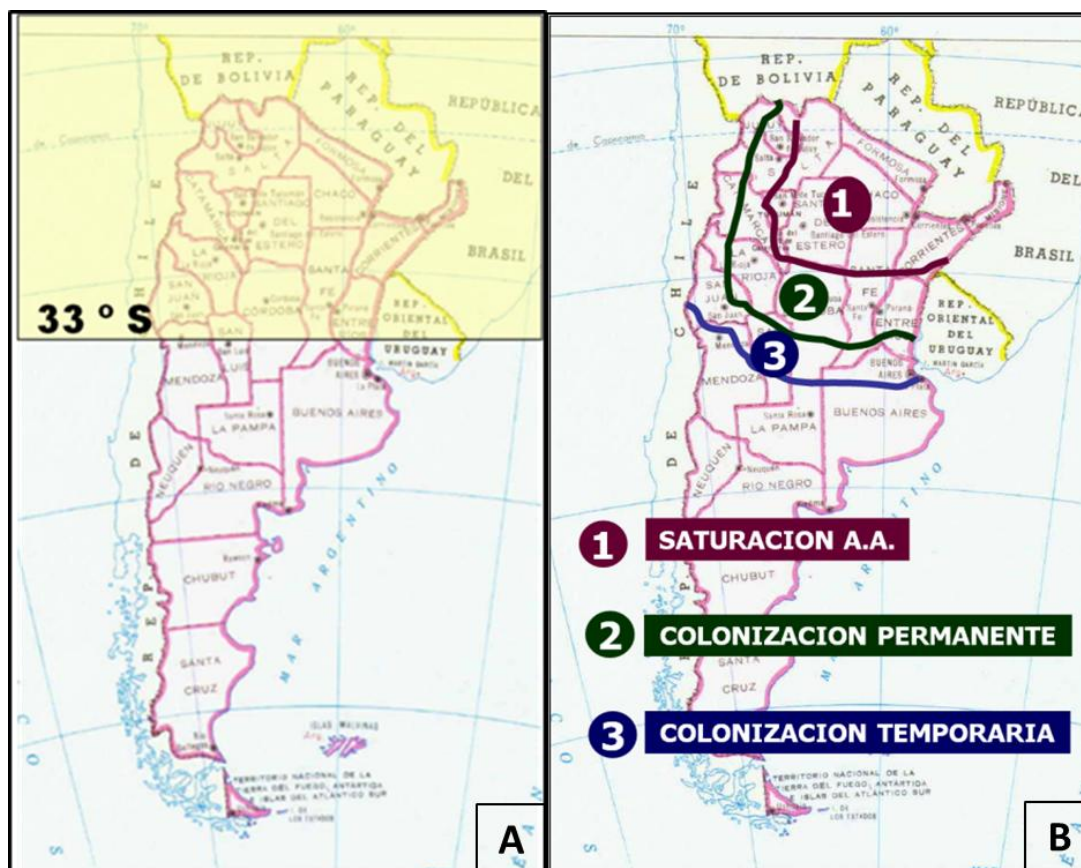


Figura 6. Mapas de Argentina con los resultados de los estudios de Brandeburgo *et al.* (1977) (A) y Sheppard *et al.* (1991) (B).

Años después, Sheppard *et al.* (1999) profundizaron los estudios genéticos de las poblaciones de abejas de Argentina empleando la técnica de PCR-RFLP y análisis de la región intergénica COI-COI del ADN mitocondrial. Mediante estos análisis, los autores describieron la presencia de un 25% de las abejas con haplotipo A que no pertenecían a la subespecie *A. m. scutellata*, sugiriendo que existe una sobreestimación del grado de africanización y que la subespecie *A. m. iberiensis* (proveniente del sur de la Península Ibérica, donde porta el haplotipo A) y la subespecie *A. m. intermissa* (proveniente del norte de África) se encuentran en el país.

Abrahamovich *et al.* (2007) realizaron un muestreo exhaustivo (300 colonias) en la provincia de Buenos Aires y determinaron los haplotipos mediante el uso de la técnica PCR-RFLP, analizando la región COI-COI con la enzima de restricción DraI. Estos autores reportaron que el 92% de las colonias muestreadas pertenecían al brazo evolutivo C (principalmente el haplotipo C1 descripto para *A. m. ligustica*), 2,68% al brazo evolutivo M (identificando los haplotipos M2, M3 y M6, lo que indicaría la presencia de las subespecies *A. m. mellifera* y *A. m. iberiensis*, esta última proveniente del norte de la Península Ibérica) y 5,02% correspondía al brazo evolutivo A, determinándose 4 haplotipos: A1 y A4, que son típicos de *A. m. scutellata* (especialmente A4)

en la zona norte de Buenos Aires, y los haplotipos A8 y A11, indicando la presencia de *A. m. iberiensis* (del sur de la Península Ibérica) y subespecies del norte de África.

Bibliografía

- ANDERE, C.; PALACIO, M. A.; RODRIGUEZ, E.; DOMINGUEZ, M. T.; FIGINI, E.; BEDASCARRASBURE, E. 2000. Evaluation of honey bees defensive behavior in Argentina. I. A Field Method. *Am. Bee. J.* 140(12): 975-978.
- ANDERE, C.; GARCÍA, C.; MARINELLIA, C.; CEPEDA, R.; RODRIGUEZ, M. B.; PALACIO, M. A. 2008. Selection of morphometric variables of honeybees *Apis mellifera* to be used in ecotypes characterization in Argentina. *Ecological Modelling* Special Issue on IV Latin American Congress on Mathematical Biology. Volume 214, Issue 1, 10 June 2008, p. 53-58.
- ARIAS, M. C.; TINGEK, S.; KELITU, A.; SHEPPARD, W. S. 1996. *Apis nuluensis* Tingek, Koeniger and Koeniger, 1996 and its genetic relationship with sympatric species inferred from DNA sequences. *Apidologie*, 27(5), 415-422.
- BEDASCARRASBURE, E.; BAILEZ, O.; PALACIO, M. A.; RUFFINENGO, S.; CUENCA ESTRADA, G. (1984-2000). *Guía de Apicultura*. Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP. p. 293.
- BIERZYCHUDEK, A. 1979. *Historia de la Apicultura Argentina*. Editor H. J. Mattone. pp. 115-147.
- BIRKY, W. 1995. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* Vol. 92, pp. 11331-11338, December 1995.
- BOOKSTEIN, F. L. 1997. Morphometric tools for landmark data (p. 455).
- BRANDEBURGO, M. M.; GONÇALVES, L. S.; KERR, W. E. 1977. Effects of Brazilian climatic conditions upon the aggressiveness of Africanized colonies of honeybees. cabidigitallibrary.org.
- BROWN, M.; PAXTON, R. J. 2009. The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie*. Volume 40, Issue 3. p. 410-416.
- BUCHMANN, E.; NABHAN, G. 1996. The pollination crisis. *The Sciences*. p. 22-27.
- CARON, D. M. 1999. *Honey Bee Biology and Beekeeping*. Wicwas Press, Cheshire. pp. 355.
- CLARKE, K. E.; RINDERER, T. E.; FRANCK, P.; QUEZADA-EUÁN, J. G.; OLDROYD, B. P. 2002. The Africanization of Honey Bee (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a Study of a Massive Hybridization event Across Time. *Evolution*. 56(7): 1462-1474.
- CORNUET, J. M.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M. 1991. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics*. 128(2): 393-403.
- DE SANTIS, L.; CORNEJO, L. G. 1968. La abeja africana *Apis mellifera adansonii* en América del Sur. *Rev. Fac. Agron. La Plata*. 17: 35-44.
- ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; HARRY, M.; CORNUET, J. M. 1993. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*, 21(6), 1427-1431.

- FRANCK, P.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J. M. 2000. Molecular confirmation of a fourth lineage in honey bees from the Near East. *Apidologie* 31(2): 167-180.
- FRANCK, P.; GARNERY, L.; LOISEAU, A.; OLDROYD, B. P.; HEPBURN, H. P.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J. M. 2001. Genetic diversity of the honey bee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity* 86(4): 420-430.
- GARCÍA, C.; ANDERE, C. I.; MESINA, N.; RODRIGUEZ, E. M.; PALACIO, M. A. 2008. Análisis morfométrico de colonias de Entre Ríos-Argentina, según apiario y origen genético. *II Congreso Argentino de Apicultura*. Mar del Plata. p. 23.
- GARNERY, L.; VAUTRIN, D.; CORNUET, J. M.; SOLIGNAC, M. 1991. Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Apidologie*, 22(1), 87-92.
- GARNERY, L.; CORNUET, J. M.; SOLIGNAC, M. 1992. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*, 1(3), 145-154.
- HALL, H. G.; SMITH, D. R. 1991. Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(10), 4548-4552.
- HALL, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- JENSEN, A. B.; PALMER, K. A.; BOOMSMA, J.; PEDERSEN, B. V. 2005. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honey bee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Mol. Ecol.* 14(1): 93-106.
- KERR, W. E.; BARBIERI, M. R.; BUENO, D. 1970. Reproduction in African and Italian bees and their hybrids. *1 Congresso Brasileiro de Apicultura*. (pp. 130-135). DEMA, SC, and ACA.
- KLEIN, A.-M.; VAISSIERE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303-313.
- KOENIGER, N.; KOENIGER, G. 2000. Reproductive isolation among species of the genus *Apis*. *Apidologie*, 31(2), 313-339.
- LE CONTE, Y.; NAVAJAS, M. 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 27(2), 499-510.
- LOBO SEGURA, J. A. 2000. Highly Polymorphic DNA markers in an Africanized Honey Bee population in Costa Rica. *Genet. Mol. Biol.* 23(2): 317-322.
- MEIXNER, M. D.; COSTA, C.; KRYGER, P.; HATJINA, F.; BOUGA, M.; IVANOVA, E.; BÜCHLER, R. 2010. Conserving diversity and vitality for honey bee breeding. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 85-92.
- MEIXNER, M. D.; PINTO, M. A.; BOUGA, M.; KRYGER, P.; IVANOVA, E.; FUCHS, S. 2013. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-28.
- MLADENović, M.; RADOŠ, R.; STANISAVLJEVIĆ, L. Ž.; RAŠIĆ, S. 2011. Morphometric traits of the yellow honeybee (*Apis mellifera carnica*) from Vojvodina (Northern Serbia). *Archives of Biological Sciences*, 63(1), 251-257.

- PINTO, M. A.; JOHNSTON, J. S.; RUBINK, W. L.; COULSON, R. N.; PATTON, J. C.; SHEPPARD, W. S. 2003. Identification of Africanized Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Mitochondrial DNA: Validation of a Rapid Polymerase Chain Reaction-Based Assay. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 96(5): 679-684.
- RUTTNER, F.; TASSENCOURT, L.; LOUVEAUX, J. 1978. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. I. Material and methods. *Apidologie*, 9(4), 363-381.
- SALIZZI, E. 2014. Reestructuración económica y transformaciones en el agro pampeano: la expansión del cultivo de la soja y sus efectos sobre la apicultura bonaerense en los inicios del siglo XXI. *Estudios Socioterritoriales*, 16(1), 0-0.
- SMITH, D. R.; PALOPOLI, M. F.; TAYLOR, B. R.; GARNERY, L.; CORNUET, J.-M.; SOLIGNAC, M.; BROWN, W. M. 1991. Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *J. Hered.* 82(2): 96-100.
- SPIVAK, M.; FLETCHER, D. J. C.; BREED, M. D. 1991. *The "African" Honey Bee*. Westview Press. pp. 87-118.
- STEVANOVIC, J.; STANIMIROVIC, Z.; RADAKOVIC, M.; KOVACEVIC, S. R. 2010. Biogeographic Study of the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia based on Mitochondrial DNA analyses. *Russ. J. Genet.* 46(5): 603-609.
- TAYLOR, O. R. 1977. The past and possible future spread of Africanized honey bees in the Americas. *Bee World* 58(1): 19-30.
- WALLBERG, A.; HAN, F.; WELLHAGEN, G.; DAHLE, B.; KAWATA, M.; HADDAD, N.; SIMÕES, Z. L. P.; ALLSOPP, M. H.; KANDEMIR, I.; DE LA RÚA, P.; PIRK, C. W.; WEBSTER, M. T. 2014. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics* 46(10): 1081-1088.
- WHITFIELD, C. W.; BEHURA, S. K.; BERLOCHER, S. H.; CLARK, A. G.; JOHNSTON, J. S.; SHEPPARD, W. S.; SMITH, D. R.; SUAREZ, A. V.; WEAVER, D.; TSUTSUI, N. D. 2006. Thrice Out of Africa: Ancient and Recent Expansions of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Science* 314(5799): 642-645.